Karbapenemaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Fosfomisin ve Kloramfenikol Duyarlılıklarının Araştırılması

Investigation of Fosfomycin and Chloramphenicol Susceptibility of Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae *Strains*

Barış Ata Borsa[1], Zeynep Güngördü-Dalar[2], Asiye Karakullukçu[3], Veli Cengiz Özalp[4], Gökhan Aygün[2]

[1]Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
[2]İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
[3]Gümüşhane Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Gümüşhane, Türkiye
[4]Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Konya, Türkiye

Özet

Amaç: Antimikrobiyal direnç, tüm dünyada son yılların en ciddi sağlık sorunlarından birisidir. Son yıllarda, ülkemiz de başta olmak üzere birçok ülkede çoklu antibiyotik direncine sahip *Klebsiella pneumoniae* ciddi sorun oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı, rektal sürüntü örneklerinden izole edilen karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşlarında dirence neden olan moleküler mekanizmaların tespiti ve bu bakterilerin tedavide alternatif olabilecek kloramfenikol ve fosfomisine duyarlılıklarının araştırılmasıdır.

Yöntemler: Çalışmaya, yoğun bakım ünitesi hastalarından alınan rektal sürüntü örneklerinden 2 mg/lt meropenem içeren MacConkey agarında izole edilen 46 *K. pneumoniae* suşu dahil edilmiştir. Suşların karbapeneme dirençleri gradyan şerit yöntemiyle meropenem minimum inhibitör konsantrasyon değerleri belirlenerek doğrulanmıştır. Karbapeneme dirençli bulunan kökenlerde bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA}, bla_{IMP} ve bla_{VIM} genlerinin varlığı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Kloramfenikol duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon, fosfomisin duyarlılığı ise gradyan şerit yöntemleriyle değerlendirilmiştir.

Bulgular: Tüm *K. pneumoniae* suşlarında en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. Bunlardan, OXA-48 tipi karbapenemaz geninin tüm suşlarda pozitif olduğu, ayrıca suşların 12 (%26)’sinde OXA-48 ve NDM-1, 1 (%2)’inde ise OXA-48, NDM-1 ve IMP-1 karbapenemaz genlerinin aynı anda varlığı saptanmış-

Abstract

Objective: Antimicrobial resistance is one of the most important health problems of recent years. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains have been causing serious problems in many countries including Turkey in recent years. Aim of this study was to detect molecular mechanisms behind the carbapenem resistance in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains isolated from rectal swab samples and investigate the susceptibility of two potentially alternative drugs, fosfomycin, and chloramphenicol.

Methods: 46 *K. pneumoniae* strains isolated from rectal screening cultures of intensive care unit patients by using MacConkey agar containing 2 mg/L meropenem were included in this study. Carbapenem resistance of strains were confirmed by minimum inhibitor concentrations of meropenem obtained with gradient strip test. Presence of the bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA}, bla_{IMP} and bla_{VIM} genes were investigated by the real-time polymerase chain reaction. Broth microdilution method was used to investigate chloramphenicol susceptibility, and gradient strip test was used to investigate fosfomycin susceptibility of the strains.

Results: At least one carbapenemase gene was detected in all *K. pneumoniae* strains. While all strains were found positive for the presence of OXA-48 type carbapenemase gene, 12 (26%) out of 46 were positive for both OXA-48 and NDM-1 carbapenemase genes, and only one (2%) strain was positive for OXA-

XVIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (22-26 Mart 2017, Antalya)'nde bildirilmiştir.
Presented at the XVIIIth Turkish Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (22-26 March 2017, Antalya).

ORCID iDs of the authors: B.A.B. 0000-0003-4285-2933; Z.G.D. 0000-0003-2177-4235; A.K. 0000-0002-7117-5102; V.C.Ö. 0000-0002-7659-5990; G.A. 0000-0001-6915-9843

Cite this article as: Borsa BA, Güngördü-Dalar Z, Karakullukçu A, Özalp VC, Aygün G. [Investigation of fosfomycin and chloramphenicol susceptibility of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae strains]. *Klimik Derg*. 2020; 33(1): 15-8. Turkish.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:
Barış Ata Borsa, Linköping University, Department of Physics Chemistry and Biology, Division of Molecular Surface Physics and Nanoscience, Linköping, İsveç
E-posta/E-mail: ataborsa@yahoo.com

(Geliş / Received: 24 Eylül / September 2018; Kabul / Accepted: 10 Aralık / December 2019)
DOI: 10.5152/kd.2020.03

tır. Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşlarından sadece 3 (%6)'ü fosfomisine duyarlı bulunmuş olmakla beraber, 23 (%50)'ü kloramfenikole duyarlı bulunmuştur. Birden fazla türde karbapenemaz üreten suşlarda gerek kloramfenikol gerekse de fosfomisin direncinin daha yüksek olma eğilimi gözlenmiştir.
Sonuçlar: *K. pneumoniae* suşlarından sadece %6'sının fosfomisine duyarlı bulunması, ülkemizde dirençli kökenlerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde bir seçenek olma ihtimalinin düşük olduğunu göstermektedir. Kloramfenikol duyarlılığı fosfomisine oranla daha yüksek (%50) bulunmuş olmakla beraber, bu antibiyotiğin sistemik infeksiyonlarda kullanılmaya başlanmasıyla ilgili daha fazla klinik veriye gerek vardır. Öte yandan, farklı karbapenemazları bir arada üreten kökenler gerek kloramfenikol gerekse de fosfomisine daha dirençli olabilmektedir.
Klimik Dergisi 2020; 33(1): 15-8.

Anahtar Sözcükler: Fosfomisin, karbapenemler, *Klebsiella pneumoniae*, kloramfenikol.

48, NDM-1, and IMP-1 carbapenemase genes. Only 3 (6%) out of 46 strains were found susceptible to fosfomycin while 23 (50%) of them were susceptible to chloramphenicol. Additionally, we observed that the resistance rates to fosfomycin and chloamphenicol tended to be higher among carbapenemase producers.
Conclusions: It is estimated that fosfomycin is not going to be a good option for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains in Turkey since only 6% of them were susceptible. Although the chloramphenicol susceptibility rate (50%) was higher than fosfomycin, further clinical studies are required to provide a better knowledge about the usage of this antibiotic in systemic infections. Moreover, multiple carbapenemase producers tended to be more resistant to fosfomycin and also chloramphenicol.
Klimik Dergisi 2020; 33(1): 15-8.

Key Words: Fosfomycin, carbapenems, *Klebsiella pneumoniae*, chloramphenicol.

Giriş

Karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* türlerinin, kolonize hastaların sağlık kuruluşlarına girmesiyle beraber hızla yayılabildikleri bilinmektedir. Hastane yoğun bakım ünitelerinde bu bakterilerin yayılımının kontrolü amacıyla uygulanan önlemlerin başında, rezervuar rolü oynayan infekte ve kolonize hastaların saptanması gelmektedir (1). Bu çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu infeksiyonlara rastlandığında, kolonize hastaların varlığını saptamak amacıyla rektal sürüntü örneklerinden tarama yapılması ve pozitif hastaların izolasyonu önerilmektedir (2,3).

Karbapenemler, çoklu ilaca dirençli bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde sık kullanılan tedavi seçeneklerinden biridir. Son yıllarda, karbapenemaz üreten Gram-negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonlar özellikle hastanede yatmakta olan hastalarda ciddi tedavi sorunlarına neden olmakla beraber, morbidite ve mortaliteyi artıran en önemli sebepler arasında yer almaktadır (2,4). Bununla beraber, tüm dünyada giderek artan antibiyotik direnci ve dirençli bakterilere karşı tedavide kullanılabilecek antibiyotik seçeneklerinin kısıtlı olması, bu infeksiyonların tedavisinde zorluklar yaşanmasına neden olmaktadır. Çoklu ilaç direncine sahip mikroorganizmaların tedavisindeki bu sorun, eski antibiyotiklerin yeniden kullanımı gibi farklı tedavi arayışlarına gidilmesine sebep olmuştur (5,6). Bunlardan birisi, komplike olmayan üriner sistem infeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan fosfomisinin sistemik kullanımının gündeme gelmesi olmuştur (7,8). Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif etkinliği olan fosfomisinin çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu hastane infeksiyonları dahil olmak üzere ciddi infeksiyonların sistemik tedavisinde tek başına ve/veya kombine olarak kullanılabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur (7,9). İlk kez 1949'da kullanıma girmiş olan kloramfenikolün ise geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu infeksiyonlar dahil olmak üzere birçok infeksiyonun tedavisinde alternatifler arasında yer aldığı bilinmektedir (5,10).

Bu çalışmanın amacı, rektal sürüntü örneklerinden izole edilen karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında dirence neden olan moleküler mekanizmaların tespiti ve bu bakterilerin tedavide alternatif olabilecek kloramfenikol ve fosfomisine duyarlılıklarının araştırılmasıdır.

Yöntemler

Yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalardan tarama amacıyla alınarak Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen rektal sürüntü örneklerinden izole edilen karbapeneme dirençli 46 *K. pneumoniae* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalardan alınan sürüntü örnekleri 2 mg/lt meropenem içeren MacConkey agar besiyerine ekilmiş; 37°C'de 18-24 saat inkübasyonun ardından kültürde üreyen laktoz-pozitif Gram-negatif çomaklar BD Phoenix™ (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) otomatize idantifikasyon ve duyarlılık test sistemi kullanılarak tanımlanmıştır. *K. pneumoniae* suşlarının karbapeneme dirençleri meropenem gradyan şerit yöntemi kullanılarak European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre doğrulanmıştır. Karbapeneme dirençli bulunan bakterilerde bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA}, bla_{IMP} ve bla_{VIM} genlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla DNA izolasyonu, High Pure PCR Template Preparation (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kiti kullanılarak üretici önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri LightMix® (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Almanya) karbapenem paneli kullanılarak LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) cihazıyla çoğaltılmış; data analizleri LightCycler® 480 yazılımıyla yapılmıştır.

Kloramfenikol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Bu amaçla, katyon ayarlı Mueller-Hinton buyyonu (Biolife Italiana, Milano, İtalya) kullanılarak kloramfenikolün 0.125-32 µg/ml arasındaki seri dilüsyonları hazırlanmıştır (11). Elde edilen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri EUCAST önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Fosfomisin duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan gradyan şerit (Liofilchem S.r.l.., Roseto degli Abruzzi, İtalya) yöntemi, üretici firmanın önerileri doğrultusunda Mueller-Hinton agarı (Salubris Biyoteknoloji Ürünleri, İstanbul, Türkiye) kullanılarak uygulanmış, sonuçlar EUCAST kriterleri kullanılarak değerlendirilmiştir (12). Çalışmada, *Escherichia coli* ATCC 25922 standard suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

Bulgular

Kültürde üreyen tüm *K. pneumoniae* suşlarında en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 46 karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşunda saptanan karbapenemaz genleri değerlendirildiğinde; OXA-48 tipi karbapenemaz geninin tüm suşlarda pozitif olduğu, ayrıca bunların 12 (%26)'sinde OXA-48 ve NDM-1, 1 (%2)'inde ise OXA-48, NDM-1 ve IMP-1 karbapenemaz genlerinin aynı anda bulunduğu saptanmıştır.

Kloramfenikol için MİK değerleri, suşların sekizinde ≥256 µg/ml, birinde 64 µg/ml, sekizinde ≥32 µg/ml, üçünde 32 µg/ml, üçünde 16 µg/ml, 13'ünde 8 µg/ml, 10'unda ise 4 µg/ml olarak saptanmıştır (Tablo 1). Buna göre, suşların 23'ü (%50) kloramfenikole duyarlı olarak bulunmuştur. OXA-48'in yanı sıra NDM-1 karbapenemaz genine de sahip 12 suşun kloramfenikol duyarlılığı %30 olarak saptanırken, bu oran sadece OXA-48 karbapenemazını üretenlerde %57 olarak bulunmuştur.

Fosfomisin için gradyan şeridi yöntemiyle saptanan MİK değerleri, suşların 43'ünde ≥256 µg/ml olarak saptanmış ve dirençli olarak yorumlanmış, sadece 3 (%6) suş fosfomisine duyarlı bulunmuştur. Fosfomisine duyarlı bulunan 3 suş sadece OXA-48 karbapenemaz geni açısından pozitifken, fosfomisine dirençli bulunan 43 suştan 30'unda sadece OXA-48, 13'ünde ise OXA-48'in yanı sıra diğer karbapenemazların varlığı da saptanmıştır (Tablo 2). Ayrıca, fosfomisine duyarlı üç suşun tamamının aynı zamanda kloramfenikole de duyarlı olması dikkat çekmiştir.

İrdeleme

Gram-negatif bakterilerde öncelikle sınıf A (örneğin KPC) ve sınıf B (örneğin IMP, VIM ve NDM) β-laktamazlarla başlayan, ancak sonrasında Türkiye başta olmak üzere birçok ülkede sınıf D (örneğin OXA-48) β-laktamazların hızla yayılmasıyla devam eden karbapenem direnci ciddi tedavi sorunlarına yol açmaktadır (13). Çalışmamızda da karbapeneme dirençli olduğu tespit edilen tüm bakterilerde pozitif bulunan OXA-48 tipi karbapenemaz, diğerlerine oranla zayıf enzimatik aktivitesi olmasına rağmen ciddi direnç sorunu oluşturmaya devam etmektedir. Bu ve benzeri karbapenemaz enzimlerini kodlayan genlere sahip bakterilerle kolonize olan hastaların hastaneye yatış sırasında tespit edilmesinin, bu bakterilerin yayılmasının engellenmesi açısından büyük önem arz ettiği kanaatindeyiz.

Tablo 1. *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Kloramfenikol Duyarlılıkları

Karbapenemaz Türü	Duyarlı Sayı (%)	Dirençli Sayı (%)
OXA-48 (n=33)	19 (83)	14 (61)
OXA-48 + NDM-1 (n=12)	4 (17)	8 (35)
OXA-48 + NDM-1 + IMP-1 (n=1)	0	1 (4)
Toplam (n=46)	23 (50)	23 (50)

Tablo 2. *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Fosfomisin Duyarlılıkları

Karbapenemaz Türü	Duyarlı Sayı (%)	Dirençli Sayı (%)
OXA-48 (n=33)	3 (100)	30 (70)
OXA-48 + NDM-1 (n=12)	0	12 (28)
OXA-48 + NDM-1 + IMP-1 (n=1)	0	1 (2)
Toplam (n=46)	3 (6)	43 (94)

Son yıllarda çoklu ilaca dirençli bakteri sorununun sürekli artış göstermesi, bu infeksiyonlarda kullanılan antibiyotik tedavilerinin yeniden gözden geçirilmesini gerekli kılmıştır. Fosfomisin, öncelikle üriner sistem infeksiyonlarının tedavisinde kullanılıyor olmakla beraber, karbapenemaz üreten Gram-negatiflerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde de yeni bir alternatif olarak ele alınmaktadır (8). Literatürde çoklu ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerin fosfomisin duyarlılık oranları yüksek bildirilmiş olmasına rağmen, çalışmamıza dahil edilen karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşlarından sadece 3 (%6)'ünün fosfomisine duyarlı bulunması, ülkemizde böyle bir uygulamadan önce direnç oranlarının belirlenmesi gerektiğini göstermiştir (14,15). Çalışmamızda kloramfenikol duyarlılığı fosfomisine oranla daha yüksek bulunmakla beraber; Eliakim-Raz ve arkadaşları (16) yaptıkları çalışma neticesinde kloramfenikolün solunum yolu infeksiyonları ve menenjitlerde monoterapi olarak kullanıldığında mortalitenin artması nedeniyle ilk seçenek olarak kullanılamayacağını, ancak çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu infeksiyonlarda başka alternatif olmadığında kullanılabileceğini belirtmişler; ayrıca bu antibiyotiğin sistemik infeksiyonlarda yeniden kullanılmaya başlanmasıyla ilgili daha fazla klinik çalışmaya gerek duyulmakta olduğunu vurgulamışlardır.

Gram-negatif bakterilerde antimikrobiyal direnç oranlarının tüm dünya çapında hızla artması, özellikle karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* türlerinin neden olduğu ciddi infeksiyonlarda tedavi seçeneklerini çok sınırlı kılmakla beraber, en uygun tedavi stratejileri olarak günümüzde mevcut olan antimikrobiyal ajanların optimizasyonu ve kombinasyon terapileri görünmektedir. Bu infeksiyonların engellenmesinde ise yatan hastalardaki gastrointestinal kolonizasyonların saptanması başta olmak üzere, sürveyans kültürlerinin alınması ve diğer infeksiyon kontrol önlemlerinin düzenli şekilde uygulanması önem taşımaktadır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Kaynaklar

1. Lin MY, Lyles-Banks RD, Lolans K, *et al.* The importance of long-term acute care hospitals in the regional epidemiology of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis.* 2013; 57(9): 1246-52. [CrossRef]
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58(10): 256-60.
3. Ben-David D, Maor Y, Keller N, *et al.* Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010; 31(6): 620-6. [CrossRef]
4. Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat *JAMA.* 2008; 300(24): 2911-3. [CrossRef]

5. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37(5): 415-9. [CrossRef]
6. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10(1): 43-50. [CrossRef]
7. Michalopoulos AS, Livaditis IG, Gougoutas V. The revival of fosfomycin. *Int J Infect Dis*. 2011; 15(11): e732-9. [CrossRef]
8. Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu XH, Falagas ME. Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(2): 255-68. [CrossRef]
9. Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomycin: Use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(7): 1069-77. [CrossRef]
10. Laferriere CI, Marks MI. Chloramphenicol: Properties and clinical use. *Pediatr Infect Dis*. 1982; 1(4): 257-64. [CrossRef]
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-third Informational Supplement*. CLSI Document M100-S23. Wayne, PA: 2013.
12. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, valid from 2017-03-10 [İnternet]. Basel, Switzerland: EUCAST [erişim 15 Mart 2018]. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
13. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(7): 1597-606. [CrossRef]
14. Tuon FF, Rocha JL, Formighieri MS, *et al*. Fosfomycin susceptibility of isolates with blaKPC-2 from Brazil. *J Infect*. 2013; 67(3): 247–9. [CrossRef]
15. Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, *et al*. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(10): 2288–94. [CrossRef]
16. Eliakim-Raz N, Lador A, Leibovici-Weissman Y, Elbaz M, Paul M, Leibovici L. Efficacy and safety of chloramphenicol: joining the revival of old antibiotics? Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(4): 979-96. [CrossRef]